昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2016, 59(2): 192 - 199 doi:10.16380/j.kcxb.2016.02.009

革兰氏阳性菌苏云金芽孢杆菌和革兰氏阴性菌大肠杆菌诱导的柞蚕蛹生理指标变化

付盈盈[1], 马玉堃[1,3], 任淑文[2], 杨立军[2], 刘春光[1],
付海燕[1], 侯跃莹[1], 杨峰山[1,*]

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江省蚕业研究所, 哈尔滨 150086;
3. 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】明确柞蚕 *Antheraea pernyi* 对外源微生物防御性生理变化规律,为柞蚕的病害防治和合理饲养提供理论依据。【方法】本研究选用革兰氏阳性菌苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringeinsis* (*Bt*)和革兰氏阴性菌大肠杆菌 *Escherichia coli* (*Ec*)为外源诱导微生物,调整至 $10^6 \sim 10^8$ cfu/mL 菌液,灭活后处理柞蚕蛹,诱导 24,48, 72 和 96 h 后不同时间测定血淋巴蛋白含量、PO 活性、CAT 活性、抗菌活性和溶菌酶活性等生理指标。【结果】*Ec* 和 *Bt* 诱导柞蚕蛹导致各生理指标出现显著变化,但两种菌株诱导生理指标变化规律差异明显,*Ec* 高浓度诱导 72 h 会增加血淋巴蛋白含量,而 *Bt* 各浓度诱导会在 24, 48 和 96 h 增加血淋巴蛋白含量。免疫防御关键酶系 PO 和 CAT 活性变化规律在不同菌株诱导后差异更明显,*Ec* 诱导后,PO 活性随着时间增加表现为先升高后降低的趋势,CAT 活性呈现"升高-降低-升高"的规律;而 *Bt* 诱导后 PO 活性表现为"升高-降低-升高"的规律,CAT 活性随诱导时间增加变化规律不明显,但有随菌液浓度增加而降低的趋势。对抗菌活性测定表明,*Ec* 和 *Bt* 诱导都会显著增加蛹粗酶液抗菌活性,溶菌酶活性也会极显著增加,但 2 个指标高峰值出现的时间会有明显差别。【结论】本研究结果表明 *Ec* 和 *Bt* 不同处理均可诱导柞蚕蛹产生明显防御反应,但柞蚕蛹生理指标变化规律与不同种类微生物及处理时间和浓度有关,推测革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有不同的诱导防御反应机制。研究结果可以为外源微生物侵染柞蚕后的免疫防御反应规律提供理论指导。

关键词: 柞蚕; 大肠杆菌; 苏云金芽孢杆菌; 免疫; 酶活性

中图分类号: Q965.8 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)02-192-08

Changes in physiological indices of *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) pupae induced by gram-positive bacteria *Bacillus thuringeinsis* and gram-negative bacteria *Escherichia coli*

FU Ying-Ying[1], MA Yu-Kun[1,3], REN Shu-Wen[2], YANG Li-Jun[2], LIU Chun-Guang[1], FU Hai-Yan[1], HOU Yue-Ying[1], YANG Feng-Shan[1,*] (1. Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 2. Heilongjiang Institute of Silk Science and Research, Harbin 150086, China; 3. College of Wildlife Resource, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract:【Aim】This study aims to investigate the defensive responses in the Chinese tussah moth, *Antheraea pernyi* induced by different exogenous microbes so as to obtain measures for the disease control and breeding of the moth.【Methods】Gram-positive bacteria *Bacillus thuringeinsis* (*Bt*) and gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*Ec*) were selected as the exogenous microorganisms. The concentration of the bacterial solution was adjusted to $10^6 - 10^8$ cfu/mL. *A. pernyi* pupae were induced by inactivated bacteria

---

基金项目: 黑龙江省教育厅海外学人重点项目(1153h05); 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项资金(RC2014XK002026)
作者简介: 付盈盈, 女, 1989 年 5 月生, 黑龙江人, 硕士研究生, 研究方向为分子生态学, E-mail: 444565008@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yangfengshan@hlju.edu.cn
收稿日期 Received: 2015-08-18; 接受日期 Accepted: 2016-01-08

for 24, 48, 72 and 96 h, and the physiological indices including hemolymph protein content and the PO activity, CAT activity, antibacterial activity and lysozyme activity in hemolymph were analyzed. 【Results】*Ec* and *Bt* induced prominent changes in several physiological indices of *A. pernyi* pupae. But the patterns of physiological indices induced by the two bacteria were distinctly different. Haemolymph protein content in *A. pernyi* pupae increased at 72 h after induction by high concentrations of *Ec*, while it increased at 24, 48 and 96 h after induction by *Bt* at various concentrations. The activities of immune defense key enzymes including PO and CAT changed remarkably. The PO activities increased first and then decreased, while the CAT activities showed an increase-decrease-increase tendency after induction by *Ec*. The PO activities showed an increase-decrease-increase fluctuating pattern, while the CAT activities had no obvious alteration after induction by *Bt*. Antibacterial activity assay showed that *Ec* and *Bt* induced a significant increase in antibacterial activity and lysozyme activity in crude extracts of pupae. But the peak time of antibacterial activity and lysozyme activity was distinctly different. 【Conclusion】The research results indicated that different treatments of *Ec* and *Bt* can induce distinct defense responses in *A. pernyi* pupae, and the variation patterns of physiological indices are related to different kinds of microorganisms and treatment time and concentration. It is speculated that gram positive bacteria and gram negative bacteria have different induced defense mechanisms. We propose that the several physiological indices can be used as markers for immune defense response to exogenous microbes in *A. pernyi*.

Key words: *Antheraea pernyi*; *Escherichia coli*; *Bacillus thuringiensis*; immunity; enzyme activity

昆虫在正常繁衍过程中,经常会遭受到一些细菌的侵染,严重影响其正常的生长发育,而昆虫在与细菌长期的协同进化过程中,会积极主动地形成复杂的防御体系,以寻求最适的生存对策。昆虫能在不同的外界环境中生存和发展,与其独特的免疫反应有关。在受到外源物质的刺激后,昆虫会产生一系列的非专一性免疫应答,保护虫体免受危害。昆虫这种免疫特性可能是在长期的发育与进化过程中,不断地对抗外界入侵的各种微生物而逐步建立起来的。在过去的几年中,昆虫先天免疫已被广泛研究,并且与昆虫免疫反应相关基因的全基因组被鉴定(Irving *et al*., 2001; Sackton *et al*., 2007),例如冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Christophides *et al*., 2002),埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Waterhouse *et al*., 2007),意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* (Evans *et al*., 2006),赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Zou *et al*., 2007)和家蚕 *Bombyx mori* (Tanaka *et al*., 2008)等。

柞蚕 *Antheraea pernyi* 为鳞翅目(Lepidoptera)大蚕蛾科(Saturniidae)柞蚕属 *Antheraea* 的一种大型泌丝、食用及工业原料昆虫(董艳革等, 2007),是我国重要的经济昆虫资源之一,同时还是一种重要的模式昆虫(王双等, 2013)和自然生物反应器(Huang, 2002)。因柞蚕蛹包含所有必需的氨基酸(何德硕, 1994; Zhou and Han, 2006)被认为是含高质量蛋白质的食物。柞蚕幼虫期和蛹前期都是在野外自然条件下度过,很容易受到微生物的危害。当昆虫受到侵害时,控制细菌的各种酶和代谢物质会作出相应反应,如血淋巴蛋白、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等,在昆虫防御细菌过程中起着重要的保护作用,蛹虫草 *Cordyceps militaris* 对家蚕(张军等, 2003; 柴建萍等, 2010; 胡智明等, 2012),藤黄微球 *Micrococcus luteus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 对家蝇(安春菊等, 2003),柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi* 对柞蚕 *Antheraea pernyi*(姜义仁等, 2012),大肠杆菌对德国小镰 *Blattella germanica*(张道伟和陈静, 2014)等昆虫保护酶的影响已有相关报道,而柞蚕对外源微生物防御性生理变化规律尚未见相关报道。本研究选用革兰氏阳性菌苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringeinsis* (*Bt*)和革兰氏阴性菌大肠杆菌 *E. coli* (*Ec*)为外源诱导微生物,灭活后处理柞蚕蛹,测定其血淋巴蛋白含量、PO 活性、CAT 活性、抗菌活性和溶菌活性变化,不但有利于揭示 *Bt* 和 *Ec* 对柞蚕蛹的生理生化机制,还可为柞蚕蛹免疫反应响应机制提供基础数据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

柞蚕 *A. pernyi*,品种青六号,由黑龙江省蚕业研究所提供,在黑龙江省蚕业研究所宾县科研实验基地放养,9 月下旬收茧,室温储存至滞育期,11 月中

旬放到种茧库 ±2℃保存,实验时剖茧取蛹随机取样,选取均匀一致健康蛹放室温活化 24 h 备用。

1.2 供试菌种

大肠杆菌 *E. coli* DH5α、苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* H37 均由本实验室保藏。

1.3 主要试剂

PBS 缓冲液、邻苯二酚、考马斯亮蓝、苯基硫脲、牛血清蛋白及其他试剂均为国产分析纯。

1.4 菌液的制备和柞蚕蛹的诱导

Ec 和 *Bt* 在 4℃用 3% 的福尔马林浸泡 24 h(失去致病性,保持诱导性),无菌水洗涤 3 次,分别配制成 10^6, 10^7 和 10^8 cfu/mL,用一次性无菌注射器从柞蚕蛹第 1 腹节处注射,每头注射 50 μL。对照组注入 50 μL 生理盐水。处理后的蛹置于 25℃、RH 60% ~80% 条件下孵育,取 24, 48, 72 和 94 h 样品备用,每次取柞蚕 4 头,每组 3 个生物学重复。

1.5 粗酶液取样

参考吴小锋等(1997)进行,把含有少量苯基硫脲的离心管放入冰上预冷,用消毒解剖针刺破柞蚕的尾角,使其淋巴液快速滴入离心管中,摇匀,3 000 r/min 离心 15 min。取上清液作为待测粗酶液样品。

1.6 测定指标与方法

血淋巴中蛋白质含量的测定:参照 Bradford (1976)的考马斯亮蓝 G-250 方法。

酚氧化酶(PO)活性的测定:参照 Benjamin 和 Montgomery(1973)方法,酶活力单位为 $\triangle OD_{410nm}$ · U/mL。

过氧化氢酶(CAT)活性的测定:参照 Beers 和 Sizers(1952)方法,酶活力单位为 $\triangle OD_{240nm}$ · U/mL。

抗菌活性测定:参照董文娟等(2007)比浊法方法进行,取粗酶液与菌液共育(1∶10, v/v)以未加粗提液的菌液为对照,测定 OD 值,计算抗菌活性。

溶菌酶活性测定:用 0.1 mol/L pH 6.4 的 PBS 缓冲液将溶壁微球菌 *Micrococcus lysoleikticus* 配成一定浓度的菌悬液,使其在 450 nm 波长处的吸光度值约为 0.35。取 3 mL 该悬液与 50 μL 待测血清于试管中混匀,用分光光度计于 450 nm 处测吸光度(A_0),然后置于 37℃水浴保温 30 min,取出后立刻置冰浴中 10 min 以终止反应,测定其在 450 nm 处的光密度值 A,酶活力单位 $U = (A_0 - A)/A_0$。

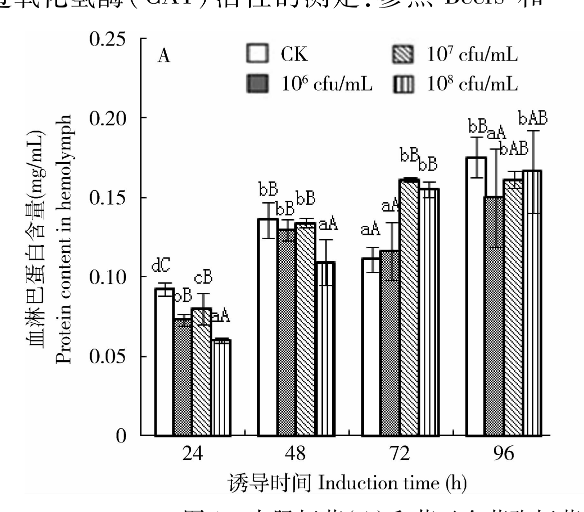
1.7 数据统计分析

采用 Microsoft Excel 和 SPSS20.0 软件对实验数据进行统计分析,*F* 检验采用单变量多因子方差分析,多重比较采用 Duncan 氏法。

2 结果

2.1 *Ec* 和 *Bt* 诱导对柞蚕蛹血淋巴蛋白含量的影响

各浓度 *Ec* 诱导处理柞蚕蛹的血淋巴蛋白质含量随时间延长而增加,除了 72 h 10^7 和 10^8 cfu/mL 处理组有正向诱导增加血淋巴蛋白质含量外,其他不同浓度处理都表现为减少血淋巴蛋白质含量的趋势(图 1: A)。*Bt* 各浓度处理组血淋巴蛋白含量表现为 48 h 之前增加,72 h 趋缓,96 h 又增加的趋势(图 1: B),在 24, 48 和 96 h 各处理中,随着菌株浓度增加,极显著提高血淋巴蛋白含量($P < 0.01$)。



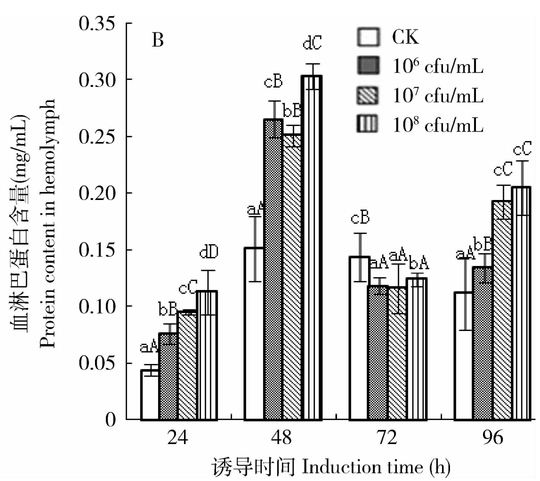


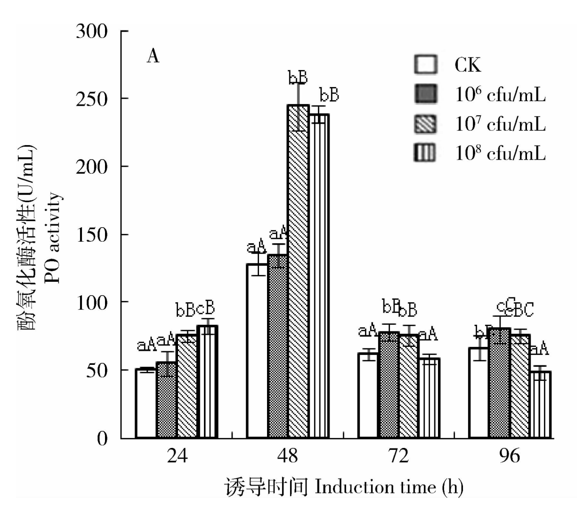
图 1 大肠杆菌(A)和苏云金芽孢杆菌(B)诱导柞蚕蛹血淋巴蛋白含量变化

Fig. 1 Change in hemolymph protein content in *Antheraea pernyi* pupae induced by *Escherichia coli* (A) and *Bacillus thuringeinsis* (B)

CK: 生理盐水 Physiological saline. 图中数据为 3 次重复平均值 ± 标准误,不同小写字母表示同一时间不同处理差异显著($P < 0.05$, Duncan 氏检测),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$, Duncan 氏检测);下图同。Data in the figure are means ± *SE* of three replicates. Different lowercase and uppercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test), and extremely significant difference ($P < 0.01$, Duncan's multiple range test) among different treatments at the same time. The same for the following figures.

2.2　*Ec* 和 *Bt* 诱导对柞蚕蛹酚氧化酶活性的影响

外源微生物诱导对柞蚕蛹酚氧化酶(PO)活性均有较大影响，但不同菌的处理 PO 活性变化趋势差异较大，而且程度也有差异。*Ec* 诱导后柞蚕蛹 PO 活性 48 h 之前随诱导时间延长，菌液浓度的升高而增加，48 h 时 PO 活性达到最大，10^6，10^7 和 10^8 cfu/mL 处理组分别是对照组 1.05，1.90 和 1.86 倍，而后 72 和 96 h 降至最低(图 2：A)；而 *Bt* 诱导后柞蚕蛹 PO 活性中，呈现出“升高-降低-升高”趋势，PO 活性明显变化($P<0.01$)，并且 72 h PO 活性降至最低；而 24 h 时 PO 活性 10^8 cfu/mL 明显高于对照组，48 h 时 PO 活性均显著低于对照组，72 和 96 h 时均显著高于对照组($P<0.01$)(图 2：B)。2 种微生物诱导变化规律差异明显，表明柞蚕蛹对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的侵染应激程度存在差异。



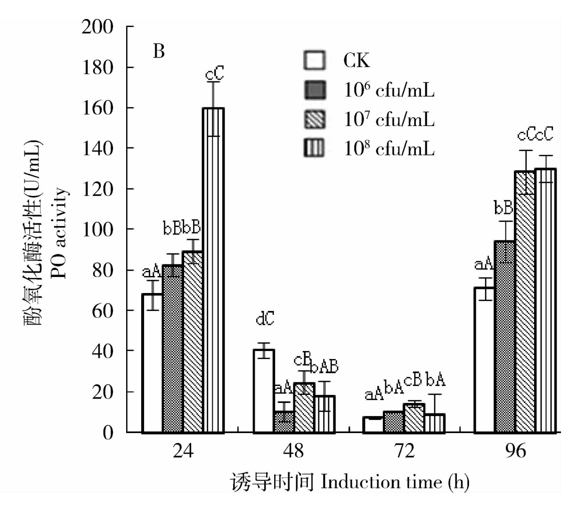
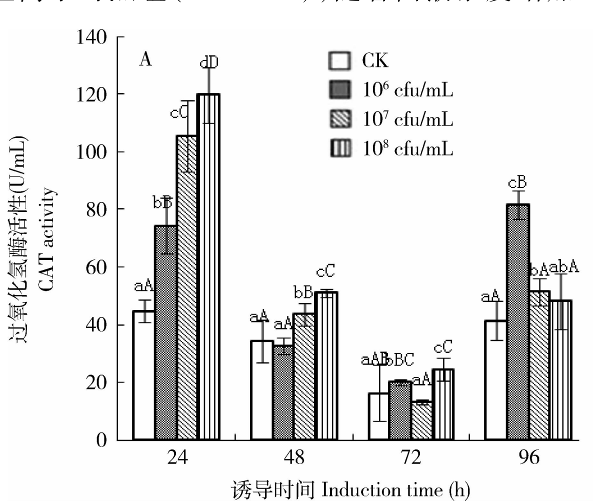


图 2　大肠杆菌(A)和苏云金芽孢杆菌(B)诱导柞蚕蛹血淋巴酚氧化酶活性变化

Fig. 2　Change in PO activity in the hemolymph of *Antheraea pernyi* pupae induced by *Escherichia coli* (A) and *Bacillus thuringeinsis* (B)

2.3　*Ec* 和 *Bt* 诱导后对柞蚕蛹过氧化氢酶活性的影响

Ec 诱导柞蚕蛹在相同菌液浓度不同处理时间中，随诱导时间增加过氧化氢酶(CAT)活性呈“升高-降低-升高”趋势(图 3：A)，且变化显著。在相同处理时间不同菌液浓度中，24 h 处理组 CAT 活性明显高于对照组($P<0.01$)，随着菌液浓度增加 CAT 活性极显著增长。72 h 时 CAT 活性降低，96 h 时 CAT 活性增加，但与菌液浓度关联度不高，低浓度处理组影响极显著；而 *Bt* 诱导后柞蚕蛹 CAT 活性变化规律不明显(图 3：B)，与诱导时间和菌液浓度关联性都不强，而且有高浓度处理会降低 CAT 活性的趋势，72 和 96 h 高浓度菌液处理组极显著低于对照。



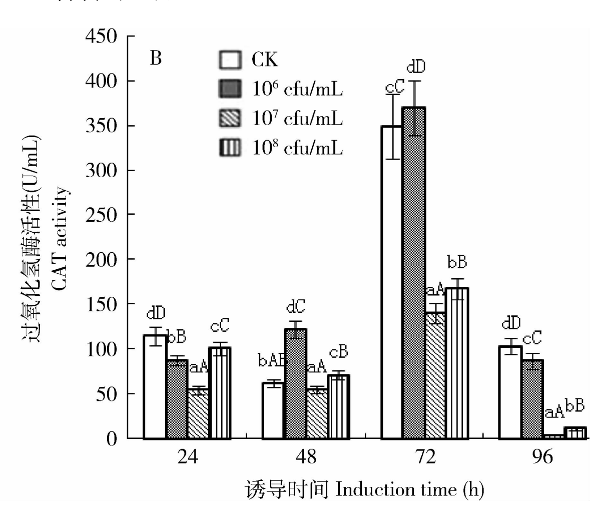


图 3　大肠杆菌(A)和苏云金芽孢杆菌(B)诱导柞蚕蛹血淋巴过氧化氢酶活性变化

Fig. 3　Change in CAT activity in the hemolymph of *Antheraea pernyi* pupae induced by *Escherichia coli* (A) and *Bacillus thuringeinsis* (B)

2.4　*Ec* 和 *Bt* 诱导后对柞蚕蛹粗提液抗菌活性的影响

Ec 和 *Bt* 诱导后对柞蚕蛹粗提液抗菌活性产生显著影响（图 4），随诱导时间增加，*Ec* 处理 24 h 时，3 个处理组抗菌活性均极显著高于对照组（$P < 0.01$），但各浓度处理差异不显著；48 h 时有随着处理浓度增加而增强的趋势，低浓度处理组在 72 h 抗菌活性达到最大，到 96 h 基本没有影响（图 4：A）；*Bt* 处理 24 h 随着处理菌株浓度增加抗菌活性增强，48 h 3 个处理抗菌活性极显著高于对照，但各处理间差异不显著，72 h 有随着处理浓度增加而增强的趋势，96 h 诱导作用趋缓（图 4：B）。

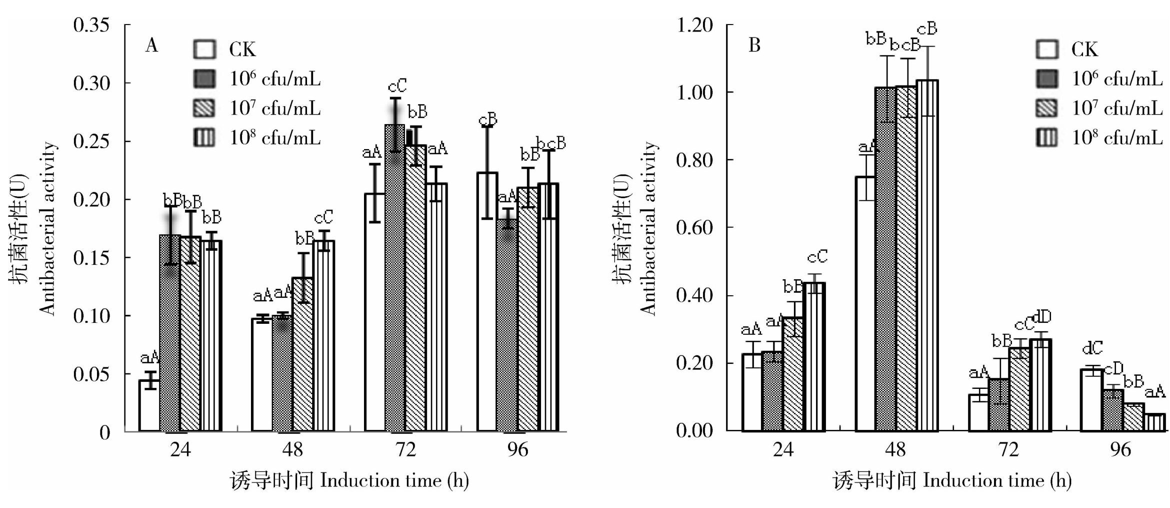


图 4　大肠杆菌（A）和苏云金芽孢杆菌（B）诱导柞蚕蛹血淋巴抗菌活性变化

Fig. 4　Change in antibacterial activity in the hemolymph of *Antheraea pernyi* pupae induced by *Escherichia coli* (A) and *Bacillus thuringeinsis* (B)

2.5　*Ec* 和 *Bt* 诱导后对柞蚕蛹溶菌酶活性的影响

Ec 诱导后，柞蚕蛹溶菌酶活性变化在 24 – 48 h 时柞蚕蛹溶菌酶活性明显升高，高浓度处理组可到达极显著差异，72 – 96 h 明显降低（图 5：A）；而 *Bt* 诱导后，在不同诱导时间中，溶菌酶活性呈现在 48 h 之前升高，且 10^8 cfu/mL 处理组差异极显著，72 h 后降低并且随着处理菌液浓度增加而降低越显著（图 5：B）。

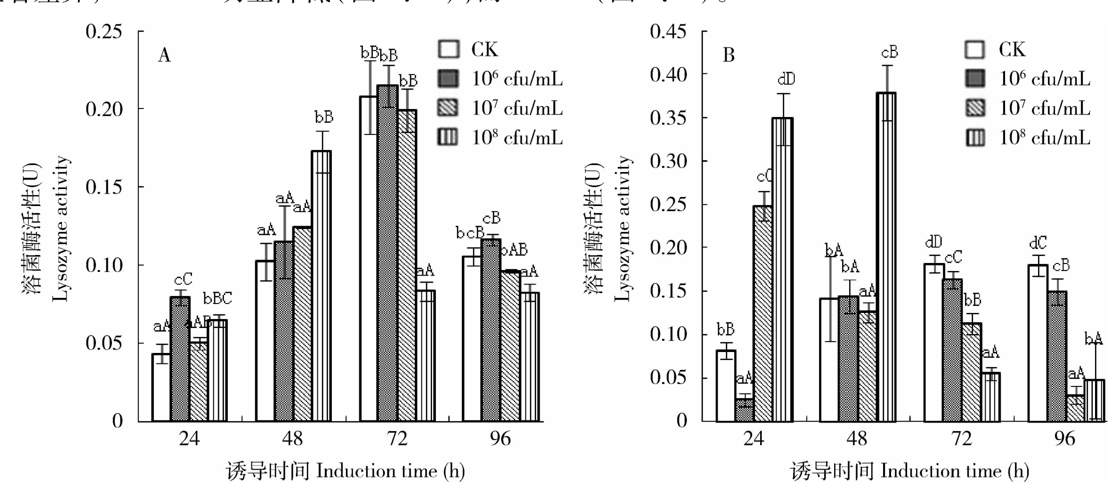


图 5　大肠杆菌（A）和苏云金芽孢杆菌（B）诱导柞蚕蛹血淋巴溶菌酶活性变化

Fig. 5　Change in lysozyme activity of in the hemolymph of *Antheraea pernyi* pupae induced by *Escherichia coli* (A) and *Bacillus thuringeinsis* (B)

3　讨论

昆虫依赖免疫应答系统能对病原微生物作出快速有效的反应，当病原微生物感染昆虫后，会诱导宿主免疫应答，产生多种蛋白参与防御。本研究检测结果表明，*Bt* 和 *Ec* 诱导柞蚕蛹血淋巴蛋白含量出现显著的变化，表明外源菌入侵刺激蚕柞蚕蛹产生

防御反应,促使脂肪体合成或分泌蛋白质量的变化(Liu, 2000; Candas *et al.*, 2003)。但2种微生物诱导血淋巴蛋白含量高峰出现的时间及变化规律差异明显,*Ec* 处理在48和72 h有正向诱导外,其他时间处理都显著低于对照,而 *Bt* 处理在48 h之前增加,72 h趋缓,96 h又增加的趋势,推测革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌引起柞蚕的免疫应答或影响柞蚕体内营养代谢的响应程度不同。

作为昆虫无脊椎动物抵御外来病原感染的PO,在昆虫无脊椎动物非特异性免疫系统中起着关键性作用,是昆虫体内最重要的免疫因子之一(刘守柱等, 2010)。PO所引起的黑化级联反应在细胞免疫系统和体液免疫系统中都有参与,也是昆虫必不可少的免疫防御反应(李凤娟, 2012)。本研究中,*Ec* 诱导PO活性表现为先升高后降低的趋势,而Bt诱导后则表现为"升高-降低-升高"的规律,*Ec* 在48 h出现高峰值,而 *Bt* 24 h出现高峰值后,在96 h又出现次高峰值。外源微生物与模式识别蛋白结合激活酚氧化酶原激活酶原(pro-PPAE)转变为具有活性的酚氧化酶原激活酶(PPAE),并通过限制性蛋白水解作用使proPO裂解,从而释放一个小肽而转变成有活性的PO(刘守柱等, 2010)。本研究表明柞蚕蛹对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的侵染应激程度存在差异,具体在模式蛋白识别还是后期转化出现差异还有待进一步研究。CAT是一种酶类清除剂,可促使 H_2O_2 分解为分子氧和水,清除体内的 H_2O_2,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。*Ec* 诱导时处理组CAT活性明显高于对照组($P < 0.01$),随着菌液浓度增加CAT活性极显著增加,而 *Bt* 诱导时无明显变化规律,可能是不同微生物激活柞蚕蛹CAT活性反应时间和清除 H_2O_2 的能力不同。这也间接说明柞蚕蛹感染 G^+ 和 G^- 时机体免疫途径不同(徐学清和赖仞, 2006; 王英, 2008)。

Ec 诱导时,抗菌活性在24－72 h呈增加,96 h无显著变化,而 *Bt* 诱导时,在48 h极显著高于对照组,24－72 h均呈增长趋势,96 h作用趋缓,2种细菌诱导后柞蚕蛹粗提液抗菌活性呈现不同的变化趋势,这可能与革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌激活昆虫免疫途径、反应时间不同有关(刘甜和罗开珺, 2011)。柞蚕溶菌酶是柞蚕体内发现的一类重要的杀菌酶类,能够导致细菌因渗透压失控而死亡(Rao *et al.*, 2010)。*Ec* 诱导溶菌酶活性时,24－48 h时溶菌酶活性升高,72－96 h明显降低;*Bt* 诱导时,溶菌酶在48 h之前升高,72－96 h降低。这可能与细菌诱导柞蚕蛹的免疫机制有关。有研究表明柞蚕体内存在Toll受体家族基因,尽管Toll通路在抗革兰阳性菌和真菌感染中的确切作用仍不十分清楚,但它的确增加了各种抗菌物质的表达,而大肠杆菌这类革兰阴性菌所激活的是IMD信号通路,由于其激活的信号通路不同,使得产生的免疫反应及持续的时间不同。Ekengren和Hultmark(1999)通过实验也证明抗真菌肽的抑杀作用大小与微生物的种类有关(Delucca *et al.*, 1997)。

综上所述,从柞蚕蛹的保护酶等生理指标的综合分析可以看出,不同外源微生物浓度诱导对柞蚕蛹的生理指标有重要影响并且两者关系紧密,这对柞蚕蛹的抗病机理研究以及优良品种选育具有重要的理论和实践意义。

参考文献(References)

An CJ, Shi M, Hao YJ, Sheng CZ, Geng H, Li DS, Du RQ, 2003. Inducement and activity analysis of antibacterial-related proteins peptides in housefly larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 46(5): 545－548. [安春菊, 石明, 郝友进, 盛长忠, 耿华, 李德森, 杜荣骞, 2003. 家蝇幼虫抗菌相关蛋白/多肽的诱导及抗菌活性分析. 昆虫学报, 46(5): 545－548]

Beers RF, Sizers IW, 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 195: 133－140.

Benjamin ND, Montgomery MW, 1973. Polyphenoloxidase of royal ann cherries: purification and characterization. *Food Science*, 38: 799－806.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248－254.

Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla LAJr, 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(1): 19－28.

Chai JP, Xie DY, Tian XJ, Ran RF, 2010. Study on defense reactions of silkworm, *Bombyx mori* to *Cordyceps militaris*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 23(4): 1308－1313. [柴建萍, 谢道燕, 田学军, 冉瑞法, 2010. 家蚕对入侵蛹虫草菌的防御反应研究. 西南农业学报, 23(4): 1308－1313]

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, vonMering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC, 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298: 159－165.

Delucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimmc, Cleveland T, Walsh TJ, 1997. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41(2): 481 – 483.

Dong WJ, Wang XY, Zhang T, Shi SL, Li Q, Chi J, 2007. Research on generation and antimicrobial activity of antibacterial substances of *Antheraea pernyi* diapause pupae. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 35(4): 990 – 991, 1091. [董文娟, 王学英, 张涛, 石生林, 李群, 迟俊, 2007. 柞蚕滞育蛹抗菌物质产生及其抑菌活性研究. 安徽农业科学, 35(4): 990 – 991, 1091]

Dong YG, Wang LS, Li XW, Lin GL, 2007. Physical and chemical characters and utilizing approach of silk. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 13(4): 88 – 89. [董艳革, 王立石, 李学文, 林国林, 2007. 蚕丝的理化性质及其利用途径. 安徽农学通报, 13(4): 88 – 89]

Ekengren S, Hultmark D, 1999. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(11): 965 – 972.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15: 645 – 656.

He DS, Pang SQ, Zhang XW, Zhao GL, He P, 1994. Study on the nutritive value of *Antheraea pernyi* protein. *Acta Sericologica Sinica*, 20(1): 49 – 51. [何德硕, 庞素勤, 张秀文, 赵国莉, 何平, 1994. 柞蚕蛹蛋白营养价的研究. 蚕业科学, 20(1): 49 – 51]

Hu ZM, Liu QM, Qiu GX, Lin ZF, 2012. Study on the innate immunity of the silkworm, *Bombyx mori*. *Guangxi Sericulture*, 46(2): 39 – 44. [胡智明, 刘清明, 邱国祥, 林忠芬, 2012. 家蚕先天性免疫的研究. 广西蚕业, 46(2): 39 – 44]

Huang YJ, Kobayashi J, Yoshimura T, 2002. Genome mapping and gene analysis of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus for improvement of baculovirus expression vector system. *Biosci. Bioeng.*, 93: 183 – 191.

Irving P, Troxler L, Heuer TS, Belvin M, Kopczynski C, Reichhart JM, Hoffmann JA, Hetru C, 2001. A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 15119 – 15124.

Jiang RY, Song J, Qin YL, Wang Y, Zang M, Zhong L, Yang RS, Shi SL, Duan YX, Qin L, 2012. Separation and identification of haemolymph proteins involved in immune response to *Nosema pernyi* infection in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 55(10): 1119 – 1131. [姜义仁, 宋佳, 秦玉璘, 王勇, 臧敏, 钟亮, 杨瑞生, 石生林, 段玉玺, 秦利, 2012. 柞蚕感染微孢子虫后血淋巴免疫应答蛋白质的分离与鉴定. 昆虫学报, 55(10): 1119 – 1131]

Li FJ, 2012. Gene Cloning and Expression Analysis of βGRP and Immulectins from the Chinese Oak Silkmoth, *Antherae apernyi*. MSc Thesis, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning. [李凤娟, 2012. 柞蚕模式识别受体 βGRP、immulectins 基因的克隆及表达分析. 辽宁大连: 大连理工大学硕士学位论文]

Liu SZ, Du XL, Dai MX, 2010. Characteristics and physiological functions of phenoloxidase from insect. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 38(34): 19249 – 19251. [刘守柱, 杜学林, 戴明勋, 2010. 昆虫酚氧化酶特性及其生理学功能. 安徽农业科学, 38(34): 19249 – 19251]

Liu T, Luo KJ, 2011. Immunity-related domains of Toll and IMD signaling pathways in *Drosophila*. *Journal of Environmental Entomology*, 33(3): 388 – 395. [刘甜, 罗开珺, 2011. 果蝇 Toll 和 IMD 信号通路中的功能结构域. 环境昆虫学报, 33(3): 388 – 395]

Liu YB, Tabashnik BE, Masson L, Escriche B, Ferre J, 2000. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 93(1): 1 – 6.

Rao XJ, Ling E, Yu XQ, 2010. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an *in vitro* approach. *Developmental and Comparative Immunology*, 34: 264 – 271.

Sackton TB, Lazzaro BP, Schlenke TA, Evans JD, Hultmark D, Clark AG, 2007. Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*. *Nat. Genet.*, 39: 1461 – 1468.

Tanaka H, Ishibashi JK, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A, Tomimoto K, Suzuki N, Yoshiyama M, KanekoY, Iwasaki T, Sunagawa T, Yamaji K, Asaoka A, Mita K, Yamakawa M, 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1087 – 1110.

Wang S, Zhong L, Wang Y, Wang XH, Jiang YR, Tan DH, Qin L, 2013. Influence of CO_2 enriched atmosphere on physiological indexes of the 3rd instar larvae of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Science of Sericulture*, 39(1): 57 – 62. [王双, 钟亮, 王勇, 王晓慧, 姜义仁, 檀德宏, 秦利, 2013. 高浓度 CO_2 饲养环境对柞蚕 3 龄幼虫部分生理指标的影响. 蚕业科学, 39(1): 57 – 62]

Wang Y, 2008. Progress in innate immunity of insect. *Immunological Journal*, 24(4): 473 – 478. [王英, 2008. 昆虫天然免疫研究进展. 免疫学杂志, 24(4): 473 – 478]

Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, Maccallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK, 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, 316: 1738 – 1743.

Wu XF, Xu JL, Cui WZ, 1997. Factors affecting the activity of superoxide dismutase in haemolymph of the silkworm. *Science of Sericulture*, 23(1): 38 – 41. [吴小锋, 徐俊良, 崔为正, 1997. 家蚕血淋巴超氧化物歧物酶活力及其影响因素. 蚕业科学, 23(1): 38 – 41]

Xu XQ, Lai R, 2006. Advances in studies of insect immunity signalling pathways. *Life Science Research*, 10(1): 7 – 11. [徐学清, 赖仞, 2006. 昆虫先天免疫信号通路研究进展. 生命科学研究, 10(1): 7 – 11]

Zhang DW, Chen J, 2014. Phenoloxidase is involved in regulating immune response to *Escherichia coli* in *Blattella germanica*

(Blattodea：Blattellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(10)：1123-1132. [张道伟，陈静，2014. 酚氧化酶参与德国小蠊对大肠杆菌的免疫应答. 昆虫学报，57(10)：1123-1132]

Zhang J, Song DL, Chen JX, 2003. Physiological and biochemical changes of the silkworm, *Bombyx mori* infected by *Cordyceps militaris*. *Acta Entomologica Sinica*, 46(6)：674-678. [张军，宋敦伦，陈建新，2003. 家蚕感染蛹虫草后的生理生化变化. 昆虫学报，46(6)：674-678]

Zhou J, Han DX, 2006. Safety evaluation of protein of silkworm (*Antheraea pernyi*) pupae. *Food Chem. Toxicol.*, 44：1123-1130.

Zou Z, Evans JD, Lu Z, Zhao P, Williams M, Sumathipala N, Hetru C, Hultmark D, Jiang H, 2007. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genom. Biol.*, 8：R177.

（责任编辑：袁德成）